



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|-----------|--|
| <p>(51) 国際特許分類6 A61K 39/39, 9/107, 9/127, 47/36</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO98/09650</p> <p>(43) 国際公開日 1998年3月12日(12.03.98)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03123</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月5日(05.09.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/236937 1996年9月6日(06.09.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 珠玖 洋(SHIKU, Hiroshi)[JP/JP] 〒514 三重県津市鳥居町191-2 合同宿舎鳥居住宅1-54 Mic, (JP) 砂本順三(SUNAMOTO, Junzo)[JP/JP] 〒525 滋賀県草津市若草2-14-1 Shiga, (JP) 中村秀男(NAKAMURA, Hideo)[JP/JP] 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社 横浜総合研究所内 Kanagawa, (JP)</p> | | <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> |
| <p>(54) Title: VACCINAL PREPARATIONS</p> <p>(54) 発明の名称 ワクチン製剤</p> <p>(57) Abstract Vaccinal preparations containing an antigen, such as a cancer cell antigen or a viral antigen, and a hydrophobized polysaccharide as an adjuvant, e.g., a hydrophobized polysaccharide wherein primary hydroxyl groups of one to five saccharide units per 100 saccharide units constituting the polysaccharide have groups represented by $-O-(CH_2)_m CONH(CH_2)_n NH-CO-O-R$ (wherein R represents alkyl or a sterol residue; m represents 0 or 1; and n represents an arbitrary positive integer), preferably the antigen being enclosed in a microparticle of an aggregate of the hydrophobized polysaccharide.</p> | | |

(57) 要約

癌細胞抗原やウイルス抗原などの抗原と、アジュバントである疎水化多糖類、例えば、多糖類を構成する糖単位100個あたり1～5個の糖単位の1級水酸基が次式： $-O-(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNH-CO-O-R$ （式中、Rはアルキル基またはステロール残基；mは0または1；nは任意の正の整数を示す）で表される基を有する疎水化多糖類とを含み、好ましくは疎水化多糖類の集合体微粒子内に封入された抗原を含むワクチン製剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード（参考情報）

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-------------|----|-------------------|----|------------|
| AL | アルバニア | ES | スペイン | LK | スリランカ | SE | スウェーデン |
| AM | アルメニア | FI | フィンランド | LR | リベリア | SG | シンガポール |
| AT | オーストリア | FR | フランス | LS | レソト | SI | スロヴェニア |
| AU | オーストラリア | GA | ガボン | LT | リトアニア | SK | スロバキア共和国 |
| AZ | アゼルバイジャン | GB | 英国 | LU | ルクセンブルグ | SL | シエラレオネ |
| BA | ボスニア・エルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | SN | セネガル |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | SZ | スワジランド |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ共和国 | TD | チャード |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TG | トーゴ |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TJ | タジキスタン |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TM | トルクメニスタン |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | TR | トルコ |
| BY | ベラルーシ | ID | インドネシア | MR | モリタニア | TT | トリニダード・トバゴ |
| CA | カナダ | IE | アイルランド | MW | マラウイ | UA | ウクライナ |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IL | イスラエル | MX | メキシコ | UG | ウガンダ |
| CG | コンゴ | IS | アイスランド | NE | ニジェール | US | 米国 |
| CH | スイス | IT | イタリア | NL | オランダ | UZ | ウズベキスタン |
| CI | コート・ジボアール | JP | 日本 | NO | ノルウェー | VN | ヴェトナム |
| CN | 中国 | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェコ共和国 | KR | 朝鮮民主主義人民共和国 | PT | ポルトガル | | |
| DE | ドイツ | KZ | カザフスタン | RO | ルーマニア | | |
| DK | デンマーク | LC | セントルシア | RU | ロシア連邦 | | |
| EE | エストニア | LI | リヒテンシュタイン | SD | スーダン | | |

明 細 書

ワクチン製剤

技術分野

本発明は、抗原と疎水化多糖類とを含むワクチン製剤に関する。さらに詳しく言うと、抗原、例えば癌細胞抗原またはウイルス抗原等とアジュバントとして作用する疎水化多糖類とを含み、該抗原及び該疎水化多糖類が複合体を形成したワクチン製剤に関する。本発明のワクチン製剤は、特に、抗原に対して特異的な細胞障害性T細胞（以下、本明細書において「CTL」と略称することがある）を活性化及び誘導する作用を有しており、癌、ウイルス性疾患、又は自己免疫疾患の予防及び／又は治療のためのワクチンとして極めて有用である。

背景技術

CTLは、そのT細胞レセプターなどを介して癌細胞やウイルス感染細胞を特異的に認識して破壊・傷害する作用を有しており、生体内での癌もしくはウイルスに対する生体防御機構として重要である。CTLのT細胞レセプターは、癌細胞やウイルス感染細胞の表面に発現されている特異抗原を直接認識するのではなく、マクロファージ、樹状細胞といった抗原提示細胞や癌細胞もしくはウイルス感染細胞それ自身の表面に発現されているMHCクラスI抗原及びそれに結合した特異抗原由来のオリゴペプチド（その特異抗原の「CTLエピトープ」）の複合体を認識することが近年明らかになった。

MHCクラスI抗原／特異抗原由来のオリゴペプチド複合体は、以下のようなプロセッシング経路を経て生成すると考えられている。すなわち、抗原蛋白質が細胞質内で合成された後、その一部は細胞内のプロテアーゼ複合体（「プロテアソーム」）によりオリゴペプチドに分解される。その後、さらにその一部（9～10アミノ酸残基）が、小胞体膜に存在する輸送タンパク質（TAP: transporter in antigen processing）によって細胞質から小胞体膜内に輸送され、その中でMHC

クラス I 抗原との親和性の高いものが優先的に MHC クラス I 抗原と結合して細胞表面に現われる。

癌細胞、ウイルス感染細胞、又は自己抗原反応性リンパ球を排除することによって癌、ウイルス性疾患、又は自己免疫疾患を予防及び／又は治療する目的で、人為的に CTL を活性化するワクチン（CTL 活性化ワクチン）の開発が試みられている。この目的を達成するためには、特異抗原を発現する癌細胞又はウイルス感染細胞それ自身で生体を免疫するか、あるいは特異抗原またはそれ由来のオリゴペプチドを抗原提示細胞の上記のプロセッシング経路に導入して MHC クラス I 抗原との複合体として発現させることが必要である。

「CTL 活性化ワクチン」を開発するために、実際には、1) 特異抗原タンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクターなどを用いて導入する方法、2) いくつかの CTL エピトープを含むある程度の大きさの特異抗原タンパク質を何らかの方法で細胞質内に導入する方法、又は 3) CTL エピトープとなりうる特異抗原由来 9 ～ 10 アミノ酸のオリゴペプチドを直接抗原提示細胞の MHC クラス I 抗原に結合させる方法などが試みられている。

これらのうち、1) の方法はいわゆる遺伝子治療に相当するものであり、一般的に、その効果及び安全性について未だ評価が定まっていないという問題がある。また、3) の方法は、実験動物においては効果が確認されているものの、ヒトに応用する場合には実際的な問題が生じると考えられる。すなわち、患者一人一人の持つ MHC クラス I 抗原には様々な種類の抗原が存在しており、そのような多様性に対応して生じる CTL エピトープの多様性をカバーする必要がある。つまり、各々の MHC クラス I 抗原に対する高親和性オリゴペプチドのアミノ酸配列モチーフを明らかにし、さらに各々の MHC クラス I 抗原に対応するカスタム化を医薬品として実現せねばならず、現実にはこのタイプのワクチンの開発は極めて困難である。

一方、2) のアプローチについてはいくつかの具体的な成功例が知られており、効果及び安全性の面で満足できることから、様々な患者に対して適用可能な CTL 活性化ワクチンの開発を可能にする方法としてもっとも期待されている。もっと

も、特異抗原タンパク質をポリペプチドのまま生体に投与して特異的CTLを活性化する場合には、何らかのアジュバントとの混合物として投与することが多い。このようなアジュバントとして、例えば、イスコム (ISCOM) (Takahashi et al., Nature, 344, 873-875, 1990)、QS-21 (Newman et al., J. Immunol., 148, 2357-2362, 1992)、マンナン被覆リポソーム (WO 92/4887号公報)、AF (Raychaudhuri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8308-8312, 1992) などが知られている。

多糖類-コレステロール誘導体がリポソームの多糖被覆剤 (特開昭61-69801号公報)、又は脂肪乳剤被覆剤 (特開昭63-319046号公報) として使用できることが知られている。また、前述のようにマンノースを含む多糖類で被覆された癌細胞抗原またはウイルス抗原-リポソーム複合体がCTL誘導活性を有することも知られている (WO 92/4887号公報参照)。

しかしながら、これらはいずれも (抗原) タンパク質をリポソーム化または脂肪乳剤化したのち、多糖類-コレステロール誘導体で被覆するものであり、多糖類-コレステロール誘導体と (抗原) タンパク質のみからなる複合体に関しては、その複合体が具体的にどのような効果を生み出すのかについては全く報告されていない。

上述したように、特異抗原タンパク質をポリペプチドのまま人体に投与して特異的CTLを活性化しようとする場合には、何らかのアジュバントとを用いることが必要であるが、現在のところ、免疫効率がよく、安全で調製の容易なアジュバントは見いだされていない。

発明の開示

そこで、本発明者らは、より簡便で効果の高いアジュバントとなりうる物質を見出すべく鋭意検討した。その結果、本発明者らは、天然多糖にアルキル基またはコレステロール基を導入した疎水化多糖類が、リン脂質を必要とせずに、極めて容易かつ効率的に癌細胞抗原タンパク質またはウイルス抗原タンパク質を内包化して複合体を形成することを見出した。また、これらの複合体を動物に投与す

ると特異的CTLが活性化され、生体防御反応をもたらすことを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、疎水化多糖類と抗原とを含むワクチン製剤、及び疎水化多糖類と抗原との複合体を含むワクチン製剤を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、疎水化多糖類の集合体微粒子内に封入された抗原を含む上記ワクチン製剤；及びアジュバントである疎水化多糖類を含む上記ワクチン製剤が提供される。該ワクチン製剤は、例えば、抗癌用、抗ウイルス用、又は自己免疫疾患治療用として用いることができる。

これらの発明の好ましい態様により、疎水化多糖類がアルキル基またはステロール残基が導入された多糖類である上記ワクチン製剤；疎水化多糖類が、多糖類を構成する糖単位100個あたり1～5個の糖単位の1級水酸基が下記式（I）：

$$-O-(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNH-CO-O-R \quad (I)$$
（式中、Rはアルキル基またはステロール残基を示し；mは0または1を示し；nは任意の正の整数を示す）で表される基を有する多糖類である上記ワクチン製剤；多糖類がプルラン又はマンナンである上記ワクチン製剤；ステロール残基がコレステロール残基である上記ワクチン製剤が提供される。

本発明のさらに好ましい態様により、抗原がMHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示され細胞障害性T細胞を惹起するタンパク質である上記ワクチン製剤；抗原がErB-2タンパク質である上記ワクチン製剤；抗原が癌細胞抗原、ウイルス抗原、又は自己抗原反応性T細胞レセプターである上記ワクチン製剤が提供される。

本発明の別の観点からは、上記ワクチン製剤を哺乳類動物に投与する工程を含む免疫感作方法、及び抗原に特異的な細胞障害性T細胞を誘導するための上記方法が提供される。さらに別の観点からは、疎水化多糖類を含むアジュバントが提供され、その好ましい態様によれば、抗原とともにワクチン製剤に配合するための上記アジュバントが提供される。さらに、上記ワクチン製剤を製造するための疎水化多糖類の使用も提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、コレステロール化マンナンまたはコレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトErbB-2タンパク質との複合体などによって免疫されたマウスに対してヒトErbB-2発現(CMS7HE)または非発現(CMS7neo)マウス癌細胞を接種した後の、各個体の腫瘍細胞の増殖曲線を示したものである。縦軸は、腫瘍の長径及び短径を測定して近似計算によって算出した腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍接種後の日数を表す。図中、1から3は、それぞれCHM-erbB2、CHM-CAB(対照群)、及びCHP-erbB2マウスのデータを示す。

第2図は、コレステロール化マンナンまたはコレステロール化プルランと癌遺伝子産物ヒトErbB-2タンパク質との複合体などによって免疫されたマウスに対してヒトErbB-2発現(CMS7HE)または非発現(CMS7neo)マウス癌細胞を接種した後の、各個体の腫瘍細胞の増殖曲線を示したものである。縦軸は、腫瘍の長径及び短径を測定して近似計算によって算出した腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍接種後の日数を表す。図中、4から7は、それぞれCHP-CAB(対照群)、ErbB-2タンパク質のみ(対照群)、CABのみ(対照群)、及び非免疫(naive)マウスのデータを示す。

第3図は、第1図と同じ条件で免疫されたマウスから得られた脾細胞を採取し、試験管内でヒトErbB-2発現Balb/cマウス由来CMS17HE細胞で刺激培養した後、 ^{51}Cr で標識された各標的細胞に対するその細胞障害活性を測定した結果を表す(図2の1から7までの略号は、第1図または第2図に記載された免疫処理群の略号と同義である)。図中、縦軸は、標識された細胞からの非特異的な ^{51}Cr の漏出分を差し引いて計算した細胞障害活性を表し、横軸は標的細胞に対する脾細胞の割合を表す。

第4図は、第3図のCHM-erbB2免疫群と同様な条件下において、さらに様々なマウス免疫細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体を1:2倍希釈の濃度で加えたときのヒトErbB-2特異的なCTL活性の変化を表したものである。図中、1は抗体無添加のデータを示し、2は抗CD3、3は抗CD4、

4は抗CD8、5は抗Kd、6は抗Dd、7は抗Ld、8は抗MHCクラスII抗体添加のデータをそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において用いられる「アジュバンド」という用語は、抗原に対する免疫応答を修飾する目的で抗原とともに用いられる物質を意味しており、通常は抗体産生や細胞性免疫の強化に用いられるもののほか、場合により免疫応答の質的变化のために用いられるものも包含する。

<1> 抗原

本発明において用いられる抗原としては、免疫を惹起する物質であれば特に限定されないが、例えば、ポリペプチド、ポリペプチド複合体、グリコプロテイン、核酸等を用いることができる。該抗原はウイルスや癌細胞などの病理学的標的そのもの、またはその一部であってもよい。あるいは、新生物組織またはウイルス感染細胞等の病的組織が発現する抗原であってもよい。本発明においては、抗原タンパク質、なかでもMHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示されCTLを惹起するタンパク質が好適に用いられる。抗原タンパク質は抗原決定基を含んでいればよく、その起源や純度は特に限定されないが、例えば遺伝子組み換え法により作製したものが好適である。抗原タンパク質の分子量は、一般的には500～100,000程度、好ましくは2,000～100,000程度である。具体的には、癌遺伝子産物、ErbB-2タンパク質、ras p21タンパク質、癌抑制遺伝子産物p53タンパク質、ウイルス由来タンパク質、またはT細胞レセプター、例えば自己抗原反応性（自己免疫疾患惹起）T細胞レセプター等の全体ならびにそれらの部分配列を含むタンパク質などが挙げられる。

<2> 疎水化多糖類

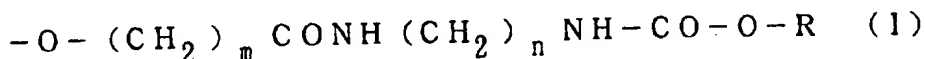
疎水化多糖類または疎水化多糖類集合体微粒子は、例えば、Akiyoshi et al., *Macromolecules*, 6, pp.3062-3068, 1993; Akiyoshi et al., *J. Proc. Japan Acad.*, 71, 71B, p.15, 1995; 特開昭61-69801号公報、特開平3-292301号公報、特開平7-97333号公報等に記載されたそれ自体既知

の方法で製造することができる。

疎水化多糖類における多糖類は、糖残基がグリコシド結合した高分子であれば特に限定されることはない。多糖類を構成する糖残基としては、例えば、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース等の単糖類、または二糖類またはオリゴ糖類などの糖類に由来する残基を用いることができる。糖残基は1, 2-, 1, 3-, 1, 4-または1, 6-グリコシド結合していてもよく、その結合は α -または β -型結合のいずれであってもよい。また、多糖類は直鎖状でも分枝鎖状のいずれであってもよい。糖残基としてはグルコース残基が好ましく、多糖類としては、天然または合成由来のプルラン、デキストラン、アミロース、アミロペクチン、又はマンナン、好ましくはマンナンまたはプルランなどが用いられる。

疎水基としては、例えば、1本鎖及び2本鎖のアルキル基またはステロール残基を100単糖あたり1~5個（重量比で5%以下）導入したものが望ましい。もっとも、疎水基は上記の基に限定されるわけではなく、封入される抗原の分子量や等電点に応じて封入率のよいものを適宜選択することができる。ステロール残基としては、例えば、コレステロール、スチグマステロール、 β -シトステロール、ラノステロール、エルゴステロール残基などが挙げられるが、好ましくは、コレステロール残基を用いることができる。また、アルキル基としては、好ましくは炭素数20以下、さらに好ましくは炭素数10~18のアルキル基を用いることができ、これらは直鎖又は分岐鎖のいずれであってもよい。

疎水化多糖類としては、例えば、多糖類を構成する糖単位100個あたり1~5個の糖単位の1級水酸基が下記式(I)：



(式中、Rはアルキル基またはステロール残基を示し；mは0または1を示し；nは任意の正の整数を示す)で表されるものが好ましい。ここで、アルキル基又はステロール残基としては好ましくは上記のものを用いることができ、nは好ましくは1~8である。なお、疎水化多糖類としては、特開平7-97333号公報に記載されたようなリンカーを介して結合したものであってもよい。

<3>疎水化多糖類による抗原の封入方法

疎水化多糖類と抗原との複合体は、疎水化多糖類の集合体微粒子と抗原とを室温で混合した後に、ゲルクロマトグラフ法で処理することにより単離・精製できる (Nishikawa, *Macromolecules*, 27, pp.7654-7659, 1994)。このようにして得られた疎水化多糖類と抗原との複合体は、そのまま本発明のワクチン製剤として用いることができるが、必要に応じて常法に従って滅菌等の操作を施すことも可能である。

< 4 > 疎水化多糖類と抗原との複合体による免疫

本発明のワクチン製剤は、他の既知のワクチン製剤等と同様に、その所定量を動物に投与することによって該動物を免疫化することができ、同様にしてワクチン製剤の力価を評価することができる。本発明のワクチン製剤の投与経路は皮下注射が一般的であるが、この投与経路に限定されることはなく、例えば、静脈内または筋肉内のような非経口投与や経口投与も採用し得る。免疫感作に必要な本発明のワクチン製剤の投与量は適宜決定できるが、例えば、通常投与量としては抗原として $50 \sim 150 \mu\text{g}$ / 回程度の量を目安とし、投与は 1 ～ 4 回行うのが適当である。

なお、本発明のワクチン製剤の製剤化の際には、それ自体既知の通常使用され得る製剤、担体及び希釈剤を、採用される投与経路にしたがって適宜使用することができる。

実施例

以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1 : コレステロール化マンナンまたはプルランと癌遺伝子産物 E r b B - 2 タンパク質との複合体の調製

疎水化多糖は秋吉らの方法 (Akiyoshi et al., *Macromolecules*, 26, 3062-3068(1993)) によって合成した。その結果、コレステロール化マンナン (以下、「CHM-55-2.3」と略記する) としては、分子量約 55,000 のマン

ナン（シグマ社製）に100単糖当たり約2.3個のコレステロール残基が導入された。また、コレステロール化プルラン（以下、「CHP-108-0.9」と略記する）としては、分子量約108,000のプルラン（林原生物化学研究所製）に100単糖当たり約0.9個のコレステロール残基が導入された。水溶液中では、1つの集合体当たり平均7分子のコレステロール残基が会合して形成された疎水性ドメインが約7個含まれるものとなった。

上記疎水化多糖をDMSOに溶解した後、PBS（pH7.9）に透析し、さらにプローブ型のソニケーター（トミー精工製URP）を用いて40Wで10分間超音波処理した。この溶液を1.2 μ m、0.45 μ m、0.2 μ mの順でフィルター濾過して疎水化多糖の集合体微粒子水溶液を得た。各溶液の疎水化多糖濃度をフェノール硫酸法で定量した結果、CHP-108-0.9は9.62mg/ml、CHM-55-2.3は6.97mg/mlであった。

一方、癌遺伝子産物ヒトErbb-2タンパク質のアミノ酸の1番目から147番目に相当するポリペプチド（Coussens et al., Science, 230, 1132, 1985）のN末端にヒスチジン・ヘキサマーを融合させた組み換えタンパク質を大腸菌を用いて発現させ、抗原タンパク質として用いた。すなわち、下記に示すオリゴヌクレオチド・プライマー2本を用いて、ヒトErbb-2タンパク質のアミノ酸の1番目から147番目に相当するポリペプチドをコードする部分を含むcDNAをPCR法にて増幅した。

HN40: 5' - AGCTGCAGTGATCACCATGGAGCT - 3'（配列表の配列番号1）

HN51: 5' - TGAATTCTATGTGAGACTTCGAAGCTGCA - 3'（配列表の配列番号2）

得られた463bpのDNA断片をT4DNAポリメラーゼ処理して末端を平滑化した後、制限酵素BclIで切断した。さらに、発現プラスミドベクター、pQE11（Qiagen社）を制限酵素HindIIIで切断し、末端をT4ポリメラーゼで平滑化した後、さらに制限酵素BamHIで切断した。このようにして作製されたpQE11ベクター由来の約3.3kbpのBamHI- Δ HindIII

断片に、上記ヒトErbB-2 cDNAのPCR増幅DNA断片をライゲーション・キット（宝酒造製）を用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。アムピシリン耐性のクローンについて制限酵素地図を作製して目的のクローンを選別した後、添付されたQiagen社のマニュアルにしたがって、組み換えタンパク質を精製した。1リットルの培地で培養した組み換え体から、およそ20mgの組み換えタンパク質を得た。

前記疎水化多糖水溶液にヒトErbB-2組み換えタンパク質溶液（PBS/6M尿素中にタンパク質2.0mg/mlを含む）を加えて混合することにより、疎水化多糖と抗原との複合体を含有する無色透明の水溶液（CHMまたはCHP 5mg/ml、ヒトErbB-2組み換えタンパク質0.25mg/ml）を得た。この溶液についてDLS（Dynamic Light Scattering）測定を行った結果、粒径約250nm、 $k_2/k_1^2 = 0.156$ の複合体微粒子を得たと考えられた（以下、このようにして得られたコレステロール化マンナンとErbB-2タンパク質との複合体を「CHM-erbB2」、コレステロール化プルランとErbB-2タンパク質との複合体を「CHP-erbB2」と略記する）。

一方、疎水化多糖が存在しない同一緩衝液を用いた条件では、ヒトErbB-2組み換えタンパク質は全て不溶化し、沈澱として析出した。

免疫実験の陰性対照としては、Carbonic Anhydrase II（シグマ社製、以下「CAB」と略記する）を用いて疎水化多糖とタンパク質との複合体を作製した（以下、コレステロール化マンナンとCABとの複合体を「CHM-CAB」、コレステロール化プルランとCABとの複合体を「CHP-CAB」と略記する）。

実施例2：CHM-erbB2及びCHP-erbB2のワクチン作用（CTL誘導効果及び制癌効果）

1群3匹の雌Balb/cマウスに、実施例1で調製したCHM-erbB2またはCHP-erbB2の懸濁液をタンパク質として一匹あたり25μgを1週間間隔で2回皮下投与した。その後、Balb/cマウスと同系のマウス線維芽肉腫細胞株（DeLeo et al., J. Exp. Med., 146, 720, 1977参照）に常法により

選択マーカーのneo遺伝子とヒトErbB-2を発現させた組み換え細胞CMS7HE、または陰性対照として同様にマウス線維芽肉腫細胞株にneo遺伝子のみを発現させた組み換え細胞CMS7neoを皮下に接種した。

接種した腫瘍の大きさを経時的に計測したところ、第1図に見られるように、CHM-erbB2またはCHP-erbB2で免疫されたマウスでは3匹中3匹ともヒトErbB-2を発現する腫瘍の増殖抑制及び完全退縮が観察された(第1図の1及び3の左欄)。一方、CHM-erbB2またはCHP-erbB2で免疫された場合でも、接種された腫瘍がヒトErbB-2を発現していない場合には腫瘍の増殖抑制効果は観察されず(第1図の1及び3の右欄)、この免疫操作の抗原特異性が示唆された。組み換えヒトErbB-2のみ(第2図の5)や、関連のないCABで免疫した場合にも(第1図の2、第2図の4および6)、腫瘍の増殖抑制効果はほとんど観察されなかった。

また、上記実験と同様の方法で免疫されたマウスから脾細胞を採取し、*in vitro*で放射線処理したBalb/cマウスと同系のヒトErbB-2発現CMS17HE細胞によって刺激した後、⁵¹Crにて標識されたCMS7HE細胞、CMS17HE細胞、CMS7neo細胞、CMS17neo細胞、及びCMS7細胞に対する細胞障害活性を常法にて測定した。その結果、第3図に示すように、CHM-erbB2またはCHP-erbB2で免疫されたマウスから得られた脾細胞を用いた場合にのみ、標的細胞数：脾細胞数の割合に依存してヒトErbB-2発現細胞(CMS7HE；CMS17HEは刺激に用いた細胞なので陽性対照に相当する)が、非発現細胞(CMS7neo、CMS17neo及びCMS7)に比べて強く殺傷された(第3図の1及び3)。

上記のうち、CHM-erbB2免疫マウスから得られた脾細胞のヒトErbB-2特異的CTL活性を測定する際に、様々なマウス免疫細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体を1：2倍希釈の濃度で加えると、CD3、CD8、マウスMHCクラスI分子のうちKdに対する抗体のみがヒトErbB-2特異的CTL活性を抑制した(第4図)。抗CD4、抗Dd、抗Ldまたは抗マウスMHCクラスII分子抗体にはそのような活性は認められなかった。このことから、観

察されたヒト E r b B - 2 特異的 C T L 活性は、M H C クラス I 拘束性の C D 8 陽性 T リンパ球によるものであることが示唆された。

産業上の利用可能性

本発明のワクチン製剤は、抗原に対する免疫応答の優れた修飾作用、特に細胞障害性 T 細胞の活性化及び誘導作用を有しており、癌、ウイルス疾患、自己免疫疾患の予防及び／又は治療用のワクチンとして用いることができる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGCTGCACTG ATCACCATGG AGCT

24

配列番号 : 2

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGAATTCTAT GTGAGACTTC GAAGCTGCA

29

請 求 の 範 囲

1. 疎水化多糖類と抗原とを含むワクチン製剤。
2. 疎水化多糖類と抗原との複合体を含むワクチン製剤。
3. 疎水化多糖類の集合体微粒子内に封入された抗原を含む請求の範囲第2項に記載のワクチン製剤。
4. アジュバントである疎水化多糖類を含む請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
5. 癌、ウイルス疾患、又は自己免疫疾患の予防及び／又は治療に用いる請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
6. 疎水化多糖類がアルキル基またはステロール残基が導入された多糖類である請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
7. 疎水化多糖類が、多糖類を構成する糖単位100個あたり1～5個の糖単位の1級水酸基が下記式(I) :

$$-O-(CH_2)_m CONH(CH_2)_n NH-CO-O-R \quad (I)$$
(式中、Rはアルキル基またはステロール残基を示し；mは0または1を示し；nは任意の正の整数を示す)で表される基を有することを特徴とする多糖類である請求の範囲第6項に記載のワクチン製剤。
8. 多糖類がプルランまたはマンナンである請求の範囲第1項ないし第7項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
9. ステロール残基がコレステロール残基である請求の範囲第6項又は第7項に記載のワクチン製剤。
10. 抗原が、MHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示され細胞障害性T細胞を惹起するタンパク質である請求の範囲第1項ないし第9項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
11. 抗原がErbB-2タンパク質である請求の範囲第1項ないし第9項のいずれか1項に記載のワクチン製剤。
12. 抗原が癌細胞抗原、ウイルス抗原、又は自己抗原反応性T細胞レセプター

である請求の範囲第 1 項ないし第 9 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

13. 細胞障害性 T 細胞を活性化する請求の範囲第 1 項ないし第 12 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤。

14. 請求の範囲第 1 項ないし第 12 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤を哺乳類動物に投与する工程を含む免疫感作方法。

15. 抗原に特異的な細胞障害性 T 細胞を誘導するための請求の範囲第 14 項に記載の方法。

16. 疎水化多糖類を含むアジュバント。

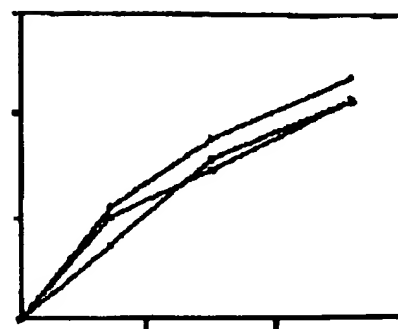
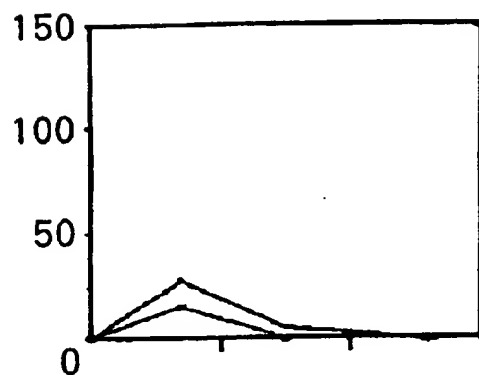
17. 抗原とともにワクチン製剤に配合するための請求の範囲第 16 項に記載のアジュバント。

18. 請求の範囲第 1 項ないし第 13 項のいずれか 1 項に記載のワクチン製剤を製造するための疎水化多糖類の使用。

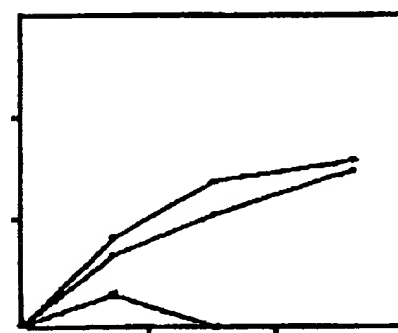
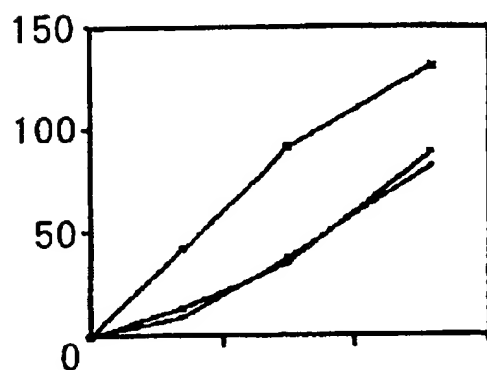
第1図

接種細胞
CMS7HE接種細胞
CMS7neo

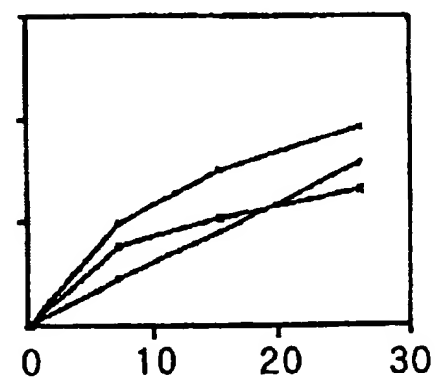
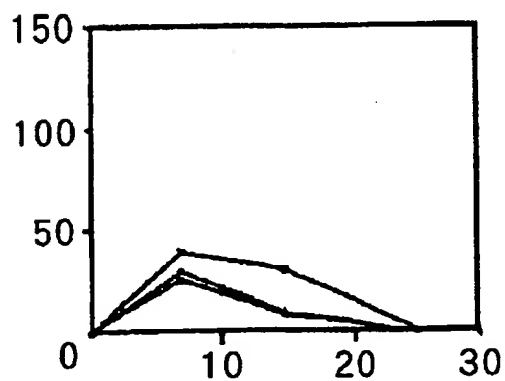
1. CHM - erbB2



2. CHM - CAB



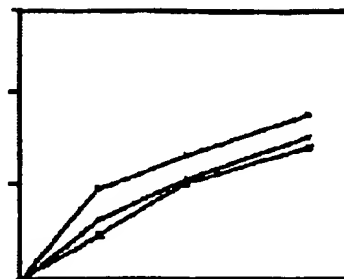
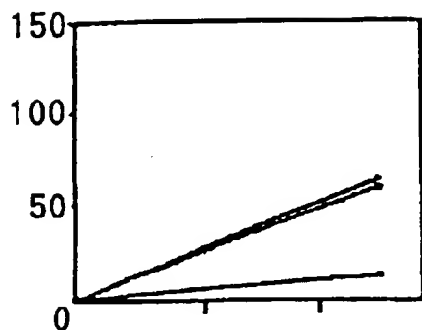
3. CHP - erbB2



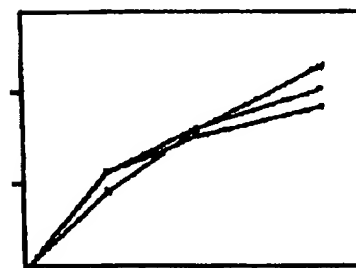
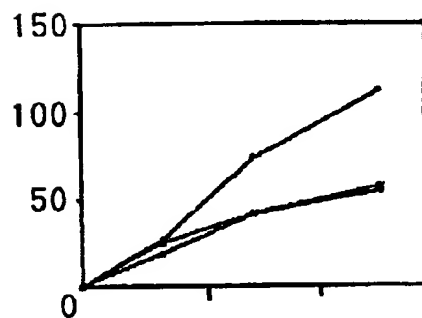
第2図 接種細胞
CMS7HE

接種細胞
CMS7neo

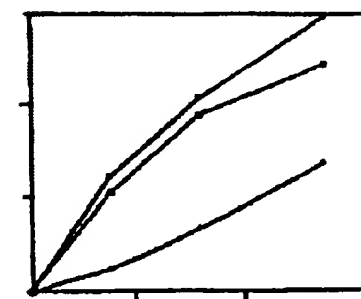
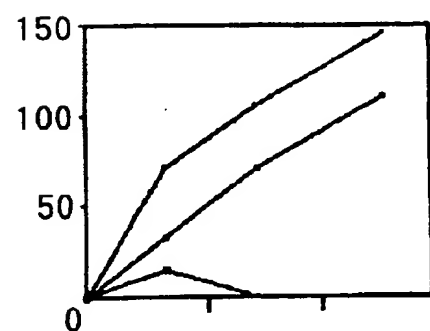
4. CHP - CAB



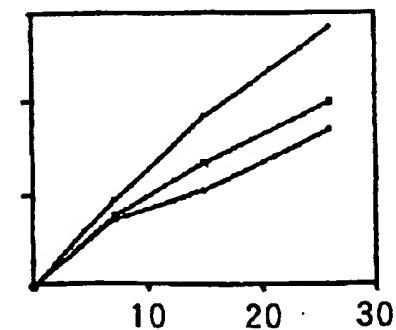
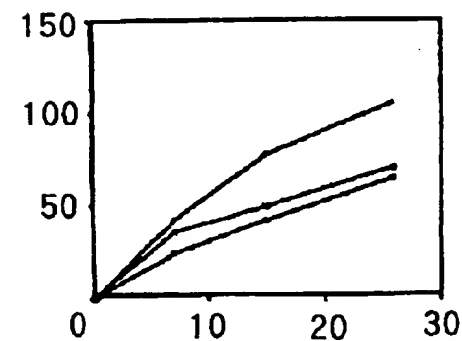
5. erbB2



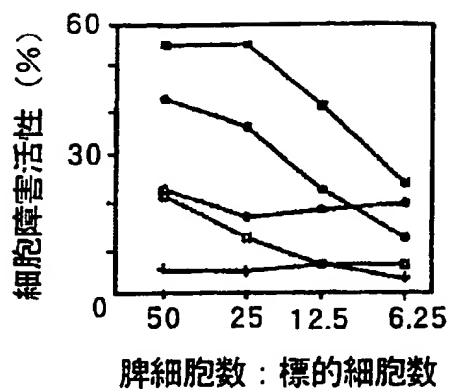
6. CAB



7. NAIVE

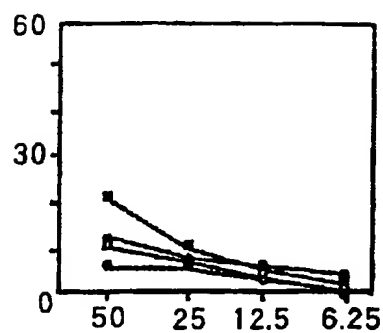


1. CHM - erbB2

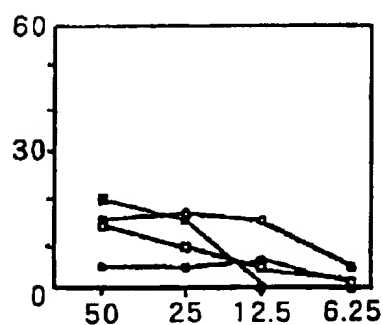


5. erbB2

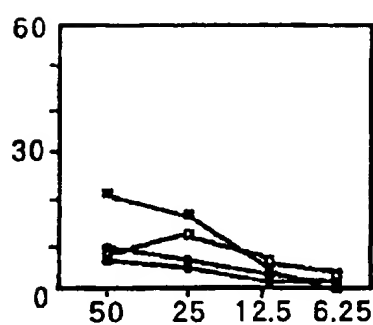
第3図



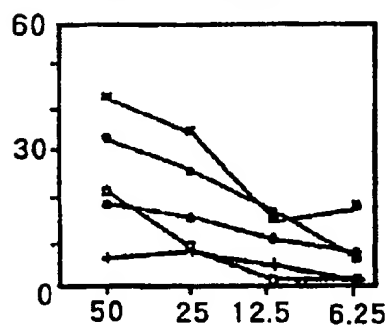
2. CHM - CAB



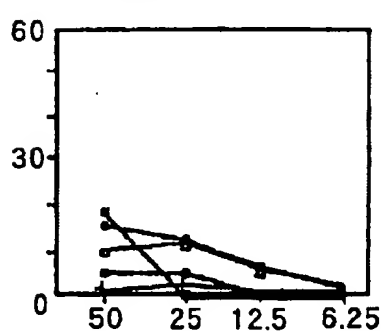
6. CAB



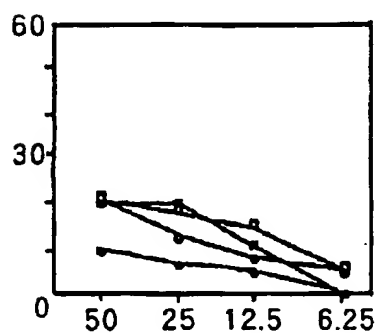
3. CHP - erbB2



7. naive

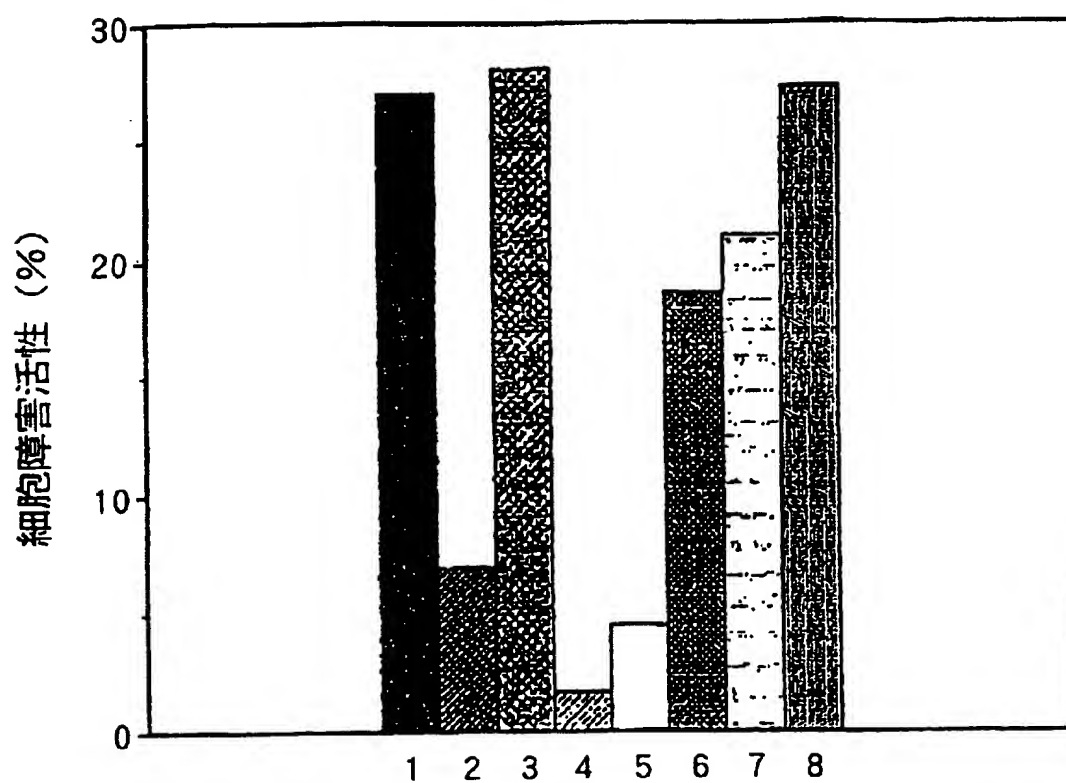


4. CHP - CAB



標的細胞: ■ CMS7HE
 ● CMS17HE
 □ CMS7neo
 ○ CMS17neo
 + CMS7 (親株)

第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K39/39, A61K9/107, A61K9/127, A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K39/39, A61K9/107, A61K9/127, A61K47/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------|---|--|
| X, Y, A | JP, 5-339169, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), December 21, 1993 (21. 12. 93), Full text & WO, 93/17702, A1 & EP, 640347, A1 | 1-3, 6, 8, 16-18 7, 9 4, 5, 10-13 |
| Y, A | JP, 7-97333, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), April 11, 1995 (11. 04. 95), Full text (Family: none) | 7, 9 4, 5, 10-13 |
| A | JP, 8-508247, A (Secretec Inc.), September 3, 1996 (03. 09. 96), Full text & WO, 94/20070, A1 & EP, 68205, A1 | 1-13, 16-18 |
| A | JP, 61-69801, A (Junzo Sunamoto), April 10, 1986 (10. 04. 86), Full text (Family: none) | 1-13, 16-18 |
| A | JP, 3-292301, A (NOF Corp.), December 24, 1991 (24. 12. 91), Full text (Family: none) | 1-13, 16-18 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 28, 1997 (28. 11. 97)

Date of mailing of the international search report

December 9, 1997 (09. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03123

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP, 56-53698, A (Merck & Co., Inc.), May 13, 1981 (13. 05. 81), Full text & EP, 23865, A1 & US, 4259324, A | 1-13, 16-18 |
| A | JP, 55-89298, A (Merck & Co., Inc.), July 5, 1980 (05. 07. 80), Full text & EP, 12083, A1 & US, 4229441, A | 1-13, 16-18 |
| A | JP, 56-12320, A (Merck & Co., Inc.), May 6, 1981 (06. 05. 81), Full text & EP, 7277, A1 & US, 4189471, A | 1-13, 16-18 |
| A | EP, 34835, A1 (Merck & Co., Inc.), September 2, 1981 (02. 09. 81), Full text (Family: none) | 1-13, 16-18 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03123

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14, 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14 and 15 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/03123

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] A61K39/39, A61K9/107, A61K9/127, A61K47/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] A61K39/39, A61K9/107, A61K9/127, A61K47/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|--|
| X, Y, A | J P, 5-339169, A (第一製薬株式会社) 21. 12月. 1993 (21. 12. 93), 公報全文 & WO, 93/17702, A1 & EP, 640347, A1 | 1-3, 6, 8, 16-18 7, 9 4.5, 10-13 |
| Y, A | J P, 7-97333, A (武田薬品工業株式会社) 11. 4月. 1995 (11. 04. 95), 公報全文, (ファミリーなし) | 7, 9 4.5, 10-13 |
| A | J P, 8-508247, A (セクレテック, インク) 3. 9月. 1996 (03. 09. 96), 公報全文 & WO, 94/20070, A1 & EP, 68205, A1 | 1-13, 16-18 |
| A | J P, 61-69801, A (砂本順三) 10. 4月. 1986 (10. 04. 86), 公報全文, (ファミリーなし) | 1-13, 16-18 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 11. 97

国際調査報告の発送日

09.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘 實 謙 二

印

4 C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

| C (続き). 関連すると認められる文献 | | |
|----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | J P, 3-292301, A (日本油脂株式会社) 24. 12月. 1991 (24. 12. 91), 公報全文, (ファミリーなし) | 1-13, 16-18 |
| A | J P, 56-53698, A (メルク・イント・カムパニー・インコーポレーテッド) 13. 5月. 1981 (13. 05. 81), 公報全文, & EP, 23865, A1 & US, 4259324, A | 1-13, 16-18 |
| A | J P, 55-89298, A (メルク・イント・カムパニー・インコーポレーテッド) 5. 7月. 1980 (05. 07. 80), 公報全文, & EP, 12083, A1 & US, 4229441, A | 1-13, 16-18 |
| A | J P, 56-12320, A (メルク・イント・カムパニー・インコーポレーテッド) 6. 5月. 1981 (06. 05. 81), 公報全文, & EP, 7277, A1 & US, 4189471, A | 1-13, 16-18 |
| A | EP, 34835, A1 (MERCK & CO. INC.) 02. 09. 81, 公報全文, (ファミリーなし) | 1-13, 16-18 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第Ⅰページの１の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14, 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲14及び15は、治療による人体又は動物の体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第Ⅰページの２の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。